



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas



**Estudio taxonómico y filogenético de las variedades de
Struthiopteris spicant (L.) Weiss (Blechnaceae,
Polypodiopsida) en Europa**

TFG Especializado – Mención de Biología Ambiental

Curso 2016/17

Autora: Sonia Molino de Miguel

Tutor: José María Gabriel y Galán

Índice

1. Resumen y Abstract	1
1.1.-Resumen y palabras clave	1
1.2.-Abstract and keywords.....	1
2. Introducción	3
3. Material y métodos.....	6
4. Resultados	9
5. Discusión	19
6. Conclusiones	21
7. Importancia y líneas futuras	22
8. Agradecimientos.....	23
9. Referencias	24
10. Anexos.....	27
1.-Material biológico.....	27
2.-Secuencias	28
3.-Cebadores forward (F) y reverse (R) y datos de los ciclos de PCR para los distintos marcadores.....	28

1.-Resumen y Abstract

1.1.-Resumen

Struthiopteris spicant (L.) Weiss es un helecho con una amplia distribución en el hemisferio norte, en América y Eurasia. Presenta cierta plasticidad fenotípica, de manera que algunas entidades subordinadas han sido descritas, siendo consideradas la mayoría variedades y formas ecológicas. Dos de estas variedades aparecen en la Península Ibérica, la más común, la variedad *spicant*, y la variedad *homophyllum* (Merino) Gabriel y Galán & Pino, que está definida como endémica del noreste de la Península. Además, varios individuos con una apariencia similar y difícilmente asignables a ninguna de las variedades descritas han sido encontrados en el norte de la Península, Salamanca y las Islas Canarias. También existe una variedad islandesa, la variedad *fallax* (Lange) Wasowicz & Gabriel y Galán, endémica de Deildartunguhver (oeste de Islandia), a la que hemos tenido acceso. Todas estas formas presentan diferencias morfológicas muy notables que nos hacen dudar de su rango taxonómico.

En este trabajo, se ha llevado a cabo un análisis morfológico y anatómico completo de 43 individuos de las tres formas. Además, en 15 individuos se ha realizado un estudio genético de sitios polimórficos utilizando marcadores cloroplásticos, nucleares y microsatélites. Los resultados obtenidos indican que algunos caracteres anatómicos (sobre todo las escamas y los tamaños foliares) podrían tener una significación taxonómica, lo que viene apoyado por los datos moleculares. En conclusión, se puede considerar que estamos tratando con entes de rango taxonómico mayor que meras variedades.

Palabras Clave: *Blechnum spicant*, helecho, Islandia, morfología, Península Ibérica, SCAR.

1.2.-Abstract

Struthiopteris spicant (L.) Weiss is a fern with a widespread distribution in the North Hemisphere, in America and Eurasia. It presents some phenotypic plasticity, in such a way that some subordinated entities have been described, most of them considered just varieties and ecological forms. Two of these varieties occur in the Iberian Peninsula, the most common variety, the variety *spicant*, and variety *homophyllum* (Merino) Gabriel y Galán & Pino, which is said to be endemic to the Northwest part of the Peninsula. In addition, several individuals with a similar appearance between them and difficult to ascribe to the varieties described have been found scattered through the north of the Peninsula, Salamanca and the Canary Islands. Also, there is an Icelandic variety, the variety *fallax* (Lange) Wasowicz & Gabriel y Galán, endemic

to Deildartunguhver (Western Iceland). All of these forms present notorious morphological differences which make us doubt about its taxonomical rank.

In this work, a complete morphological and anatomic survey of 43 individuals of the three forms had been carried out. Also, in 15 individuals, a genetic study of polymorphic sites using chloroplast, nucleus and ISSR markers has been carried out. The results show that some of the anatomical characters (especially scales and foliar size) could have a taxonomic significance, which is supported by the molecular data. In conclusion, we can consider that we are dealing with entities with higher taxonomic range than mere varieties.

Keywords: *Blechnum spicant*, fern, Iceland, morphology, Iberian Peninsula, SCAR

2.- Introducción

La familia Blechnaceae constituye un importante linaje de helechos leptosporangiados (Polypodiopsida), con alrededor de 250 especies (Smith *et al.*, 2008). Con distribución subcosmopolita, presenta dos grandes centros de diversidad, uno en América Central y del Sur y otro Austropacífico. Hasta fecha reciente, se venían reconociendo 9-10 géneros, siendo *Blechnum* el de mayor diversidad, con unas 200 especies (Rothfels *et al.*, 2012), lo que supone cerca del 80% de las especies de la familia (Kramer *et al.*, 1990). No obstante, la taxonomía y filogenia del linaje ha sido revisada en varios trabajos moleculares, tratando de resolver, desde un punto de vista filogenético, problemas de relaciones entre géneros y de especies en cada género (Shepherd *et al.*, 2007; Perrie *et al.*, 2014; Gabriel y Galán *et al.*, 2013; de Gasper *et al.* 2016a).

En base a los recientes estudios filogenéticos que revelan que el género *Blechnum* constituye un grupo polifilético (Shepherd *et al.*, 2007; Perrie *et al.*, 2014), recientemente ha sido publicada una nueva clasificación en la que la familia ha sido reestructurada en 24 géneros, siendo el género *Blechnum* el más afectado (de Gasper *et al.*, 2016b). No obstante, la diversidad de especies dentro de cada género está aún muy lejos de ser bien conocida, pues muchas especies presentan distribución muy restringida y tienen poca representación en los herbarios. Por esta razón, y con el ánimo de alcanzar un sistema razonable de clasificación y conocimiento para la familia, es necesario seguir profundizando en los linajes terminales de la misma.

La especie estudiada en este proyecto, anteriormente *Blechnum spicant* (L.) Sm, pasa a formar parte del género *Struthiopteris* (*Struthiopteris spicant* (L.) F. W. Weiss) junto con cuatro especies más: *S. niponica* (Kunze) Nakai, *S. amabilis* (Makino) Ching, *S. castanea* (Makino & Nemoto) Naka y *S. hancockii* (Hance) Tagawa. El género está compuesto, por tanto, por cinco especies templadas, mayoritariamente en Japón y China a excepción de *S. spicant*, que tiene una distribución holártica más amplia con tres núcleos disyuntos: Eurasia, norte de África y Macaronesia, noroeste de Estados Unidos y este de Asia (Figura 1) (de Gasper *et al.*, 2016b).



Figura 1.- Distribución mundial de las especies del género *Struthiopteris* construido a partir de los mapas de distribución del GBIF (2017)

La especie que nos atañe, *S. spicant*, está descrita como una planta terrestre o saxícola, en suelos ácidos o neutros. Las frondes son dimórficas, las estériles lanceoladas, pinnatisectas y formando una roseta de 20-70 cm de largo y las fértiles presentándose erguidas y más largas que las anteriores, con cenosoros muy cerca de la vena media e indusios continuos (Rolleri & Prada, 2006). No obstante, presenta cierta plasticidad fenotípica, diferencias en el tamaño de las plantas permiten separar las poblaciones europeas (hojas estériles de 5-70 cm) de las pacíficas asiáticas y americanas (hojas estériles de hasta 100 cm) (Löve & Löve, 1968). Así mismo, otros caracteres, como la tendencia a la monomorfía foliar, disminución del tamaño de los individuos y separación de los soros en unidades discretas, dejan aún más patente dicha plasticidad fenotípica, lo que ha hecho que se hayan descrito una serie de entidades, la mayor parte de ellas consideradas variedades y formas ecológicas.

En la península ibérica podemos encontrar dos de estas variedades, ambas recogidas en la monografía de *Flora Iberica* (Ormonde, 1986). La variedad típica, var. *spicant*, es la más común, con distribución por el norte, centro y oeste peninsular. Por otra parte, encontramos la variedad *homophyllum* (Merino) Gabriel y Galán & Pino, con plantas mucho más pequeñas, con hojas monomorfas o casi, todas ellas esporógenas, erectas y poco o nada contraídas, con los soros, en ocasiones, interrumpidos y frondes de no más de 20 cm (Merino, 1898). Esta variedad está citada, según la *Flora Iberica* como endémica del noroeste peninsular, en las provincias de Orense y Pontevedra en España y Douro Litoral y Minho en Portugal (Figura 2).

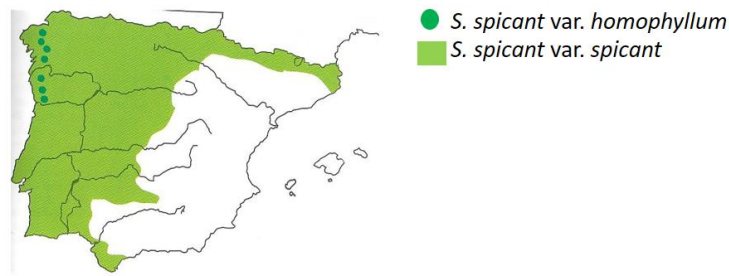


Figura 2.- Mapa de distribución clásica de las variedades ibéricas de *S. spicant* (Salvo, 1990).

Adicionalmente, se ha incluido en este trabajo una tercera variedad, endémica de Islandia, la variedad *fallax* (Lange) Wasowicz & Gabriel y Galán, también monomorfa y de tamaño muy reducido (2-5 cm), que crece exclusivamente en la fuente termal de Deildartunguhver, al oeste de Islandia, descubierta por Görlund en 1881 (Görlund, 1881). La variedad se encuentra protegida, constituyendo una población de no más de 300 individuos (Wasowicz *et al.*, 2017) que se disponen en un talud encima de la fuente.

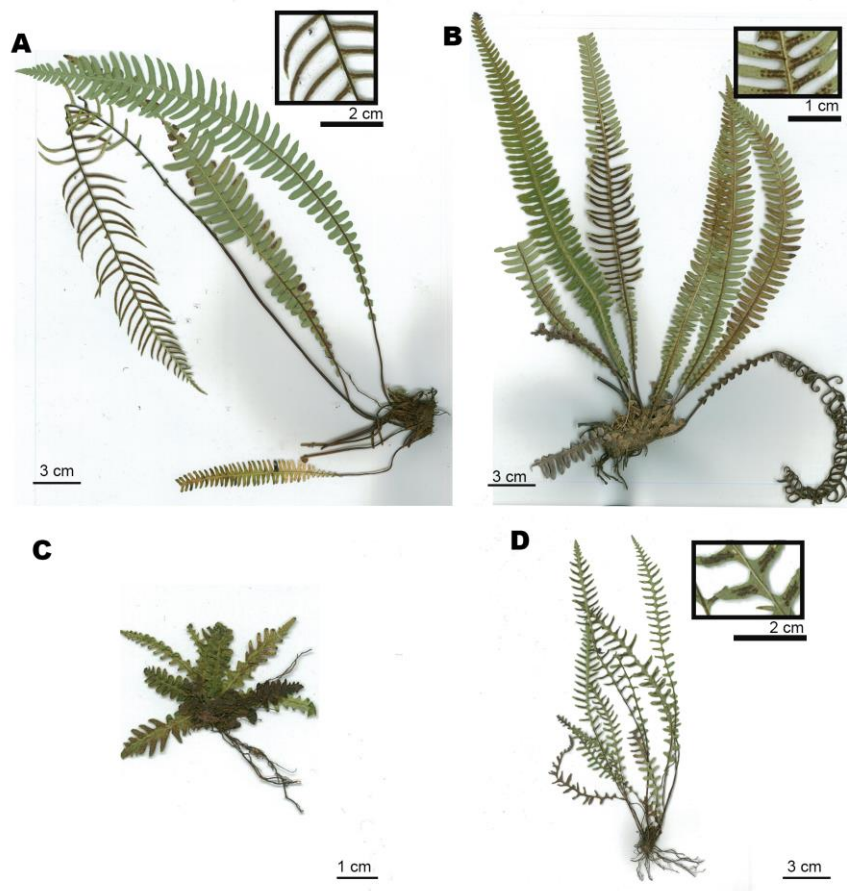


Figura 3.- Imágenes de las formas estudiadas de *S. spicant* con detalles de los soros ampliados de algunos de ellos. A. *S. spicant* var. *spicant* (CA-IND03); B. *S. spicant* forma indeterminada (AS-IND11); C. *S. spicant* var. *fallax* (IS-IND01); D. *S. spicant* var. *homophyllum* (GA-IND04).

Tras la revisión de varios pliegos de *S. spicant* del herbario MACB (Biología, UCM), se encontraron algunas plantas que no concordaban bien con ninguna de las variedades comentadas, con tamaño medio entre la variedad *spicant* y la variedad *homophyllum*, con soros fragmentados, solamente en la zona media de una fronde fértil con aspecto similar a las plantas estériles. Tras varias prospecciones de campo en Galicia, Asturias, La Rioja y Salamanca, se han obtenido algunas de estas plantas con morfología de difícil adscripción, así como plantas conformes a la variedad *homophyllum* lejos de su supuesta área de distribución (Figura 3).

Esta información llevó a pensar que, en *S. spicant*, existe una mayor variabilidad de la que ha sido reconocida previamente. Adicionalmente, existen dudas sobre si las plantas de las variedades pueden realmente hibridar, como han indicado otros trabajos (Löve & Löve, 1968), debido a la falta de experimentos que soporten esa idea, de modo que su estatus taxonómico no está clarificado.

Se propone, por tanto, este trabajo para profundizar en la taxonomía y sistemática del complejo de formas de *S. spicant*, con el objetivo de determinar si la variación morfológica del material ibérico de *S. spicant* tienen significación taxonómica. Así mismo, se compararán las plantas ibéricas con las islandesas de la variedad *fallax*.

4. Material y métodos

Estudio morfológico

El estudio morfológico se llevó a cabo en 43 especímenes (Anexo 1). Un ejemplar de cada población muestreada y de cada forma se ha depositado como testigo en el Herbario de la Facultad de Biología, UCM (MACB).

Se usaron los protocolos habituales de microscopía de plantas (Ruzin, 1999), eligiéndose como tinción el TBO 1%. Se empleó un microscopio *Nikon Labophot-2* con una cámara *Coolpix MDC*. Las fotografías se retocaron con *Photoshop CS4*.

Se observaron y midieron los siguientes caracteres macromorfológicos y anatómicos:

- Escamas: ancho de la base y longitud de tres escamas rizomáticas por individuo, en 43 individuos.

- Frondes: en tres frondes de 42 individuos se ha medido longitud de la lámina, anchura máxima de la lámina y longitud del peciolo; en su caso, se han medido separadamente las frondes estériles y las fértiles.
- Sección de la pinna fértil: en 3 pinnas de 31 individuos, se midió la distancia desde la mitad del nervio medio a la epidermis adaxial (incluida esta), y la profundidad del surco adaxial.
- Esporas y esporangios: en 20 individuos se ha contado el número de células de los anillos en al menos tres esporangios por individuo; así mismo, se ha medido el ancho y largo ecuatorial de 30 esporas, por individuo.

Análisis estadístico

Se ha construido una matriz de datos biométricos empleándose las medias de los individuos para cada carácter. Se ha comprobado la normalidad de las muestras, mediante test K-S. Casi todas las variables siguen una distribución aproximadamente normal, de forma que, en los subsiguientes análisis estadísticos, se han empleado herramientas paramétricas, con el software SPSS. En todos los casos, se ha utilizado como criterio de confianza $\alpha=0.05$.

En primer lugar, se realizó una caracterización del complejo separada por morfotipos para cada una de las variables de estudio. A continuación, se realizó un ANOVA para cada uno de los componentes mencionados con un test Post-Hoc HDS de Tukey para comprobar si la diferencia entre las medias de las variables era significativamente diferente en cada forma estudiada. Seguidamente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con aquellas variables que hubiesen mostrado diferencias significativas en los ANOVAs.

Estudio molecular

Se han seguido los procedimientos habituales para la extracción, amplificación y secuenciación de tipo Sanger, empleando kits comerciales semiautomatizados. Se ha extraído ADN de 15 individuos, señalados con (*) en el Anexo 1.

Se han amplificado los marcadores cloroplásticos: *trnL-F*, *trnG-R*, *trnS-rps4*, *psbA-trnH* y *rbcL*; el marcador nuclear *pgiC*; y los marcadores de tipo ISSR *SCAR2* y *SCAR3*, estos últimos específicos para *Struthiopteris spicant* (Korpelainen & Pietiläinen, 2007). Los

cebadores y programas de PCR proceden de trabajos previos (Ishikawa *et al.*, 2001; Korpelainen & Pietiläinen, 2007; Gabriel y Galán *et al.*, 2013) y se recogen en el Anexo 3.

En los siguientes marcadores no se detectó ninguna variabilidad genética, de forma que no se comentan más en este estudio: *trnL-F*, *trnG-R*, *trnS-rps4*, *pgiC*.

Se han empleado un total de 26 secuencias, de las que 9 son nuevas (pendientes de publicación en GenBank). Se han usado 17 secuencias previamente publicadas por otros autores recabadas del GenBank (Anexo 2). Para los análisis filogenéticos, se usaron las herramientas informáticas al uso: *Geneious R6* (Kearse *et al.*, 2012), *ClustalW* (Lankin *et al.*, 2007), *MrBayes* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), *PhyML* (Guindon *et al.*, 2010) y *jModelTest* (Darriba *et al.*, 2012). En cada caso, se realizaron árboles mediante los algoritmos de máxima verosimilitud (ML) y bayesiano (BI), con las siguientes condiciones: para ML, método de búsqueda de topología NNI y un análisis de bootstrap para el apoyo de las ramas con 500 réplicas; para el análisis BI, múltiples cadenas (4), longitud de la cadena 5.100.100, longitud de calentamiento 100.000 y longitud de ramas no restringida.

Las secuencias de los marcadores cloroplásticos *rbcL* y *psbA-trnH* se concatenaron en una única matriz de datos, dado que el cloroplasto no se recombina y que las alineaciones de los dos marcadores arrojaron el mismo modelo evolutivo en *jModelTest*. Con esta matriz se realizó una hipótesis filogenética previa del género *Struthiopteris* combinando los árboles filogenéticos obtenidos mediante los algoritmos de ML y BI, ya que arrojaron la misma topología.

Las secuencias con resultados aceptables de los marcadores *SCAR2* y *SCAR3* correspondientes a formas de *homophyllum* y el morfotipo indeterminado, se alinearon con las secuencias de la variedad *spicant* previamente publicadas (Korpelainen & Pietiläinen, 2007). Al ser estos marcadores de tipo ISSfiloR específicos de la especie *S. spicant* se carecía de grupo externo, por lo que en lugar de un árbol filogenético se realizó un estudio de mutaciones polimórficas.

4.-Resultados

Estudio morfológico

Caracterización biométrica

La siguiente Tabla 1 recoge los datos biométricos de caracterización de la muestra.

	LE cm	AE cm	PE cm	LF cm	AF cm	PF cm	GP μm	PS μm	ES mm	ESP μm
S	17,9± 2,6	3± 0,7	4± 2,5	28,8± 6,1	4,1± 1,8	11,1± 5,6	254,4± 51,8	147,5± 26	5,7±1,2 x 1,2±0,4	41±3,6 x 29,2±2,3
H	8,9± 3,8	1,9± 0,7	1,9± 1,2	12,2± 3,5	2,2± 0,6	2,6± 1,7	187,5± 46,8	79,2± 33,2	3,8±0,8 x 0,8±0,2	37±3,5 x 26±2,6
F	1,6±0,1	0,6± 0,2	0,3± 0,1	2,5± 0,5	1±0,1	0,3± 0,1	208,3± 14,4	75	0,4±0,1 x 0,2±0,01	43,5±3,5 x 32±4,2
I	16,4±4,7	2,8± 0,8	3,4± 3,7	21,4± 6,9	3,5±0,7	5,7± 5,6	272,1± 49,5	130,8± 35,2	5,8±1,4 x 1±0,3	41,2±6,8 x 27,9±4,5

Tabla 1.- Caracterización de las variables longitud de lámina estéril (LE), anchura máxima de la lámina estéril (AE), longitud del peciolo estéril (PE), longitud de lámina fértil (LF), anchura máxima de la lámina fértil (AF), longitud del peciolo fértil (PF), grosor de pinna (GP), profundidad de surco adaxial (PS), tamaño de escama (ES, largo x ancho) y tamaño de espora (ESP, largo x ancho), indicando en caso la media ± la desviación típica, en las formas de *spicant* (S, n=15), *homophyllum* (H, n=11), *fallax* (F, n=3), morfotipo indeterminado (I, n=14).

Escamas del rizoma

Las escamas del rizoma mostraron diferencias entre los morfotipos estudiados (Figura 4), en la forma general de la escama, en el tamaño, y en la zona central, que a veces se presenta esclerosada. Tanto el largo como el ancho de las escamas mostraron diferencias significativas en el análisis ANOVA (largo escama $P<0,001$; ancho escama $P<0,001$), discriminándose diferentes grupos (Figura 4).

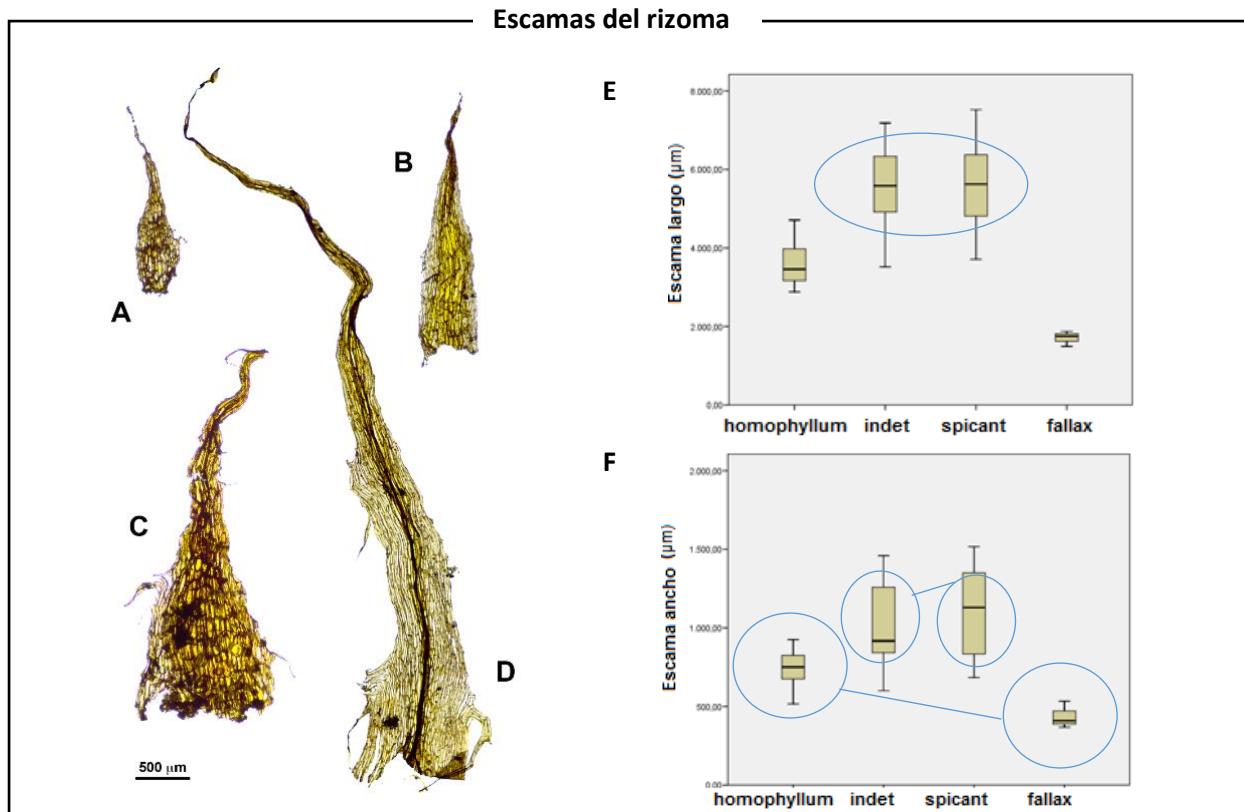


Figura 4.- Escamas del rizoma. A. *S. spicant* var. *fallax* (IS-IND01); B. *S. spicant* var. *homophyllum* (GA-IND01); C. *S. spicant* morfotipo indeterminado (SA-IND05); D. *S. spicant* var. *spicant* (MACB-59142). Diagramas de cajas en los que se rodean y/o conectan los grupos donde el test HDS de Tukey no pudo discriminar medias para los valores en las distintas formas de: E. Largo de escama F. Ancho de escama.

Vemos que las escamas son cualitativamente muy diferentes, la de la variedad *spicant* es más grande, alargada con un centro siempre esclerosado y el centro fuertemente esclerosado. La de *homophyllum* es de forma lanceolada, más pequeña, con el centro no esclerosado o levemente esclerosado. La variedad *fallax* presenta la escama más pequeña, con forma más redondeada y el centro nunca esclerosado. El morfotipo indeterminado es más variable, con tamaño entre *spicant* y *homophyllum*, lo que hace que en ocasiones sea difícil distinguirla de estas formas, ya que además en ocasiones se encuentra su zona central esclerosada.

El largo de estas es más informativo que la medida de su base, ya que esta medida nos discrimina tres grupos en los que se diferencian claramente de menor a mayor tamaño *fallax*, *homophyllum* y un grupo formado por *spicant* y el morfotipo indeterminado, mientras que la medida del ancho de la escama nos forma tres grupos donde solapan las cuatro formas.

Frondes

Todas las variables de longitud de lámina, peciolo y anchura máxima, tanto de fronde estéril como fértil, resultaron significativamente diferentes en el ANOVA ($P < 0,001$) (Figura 5).

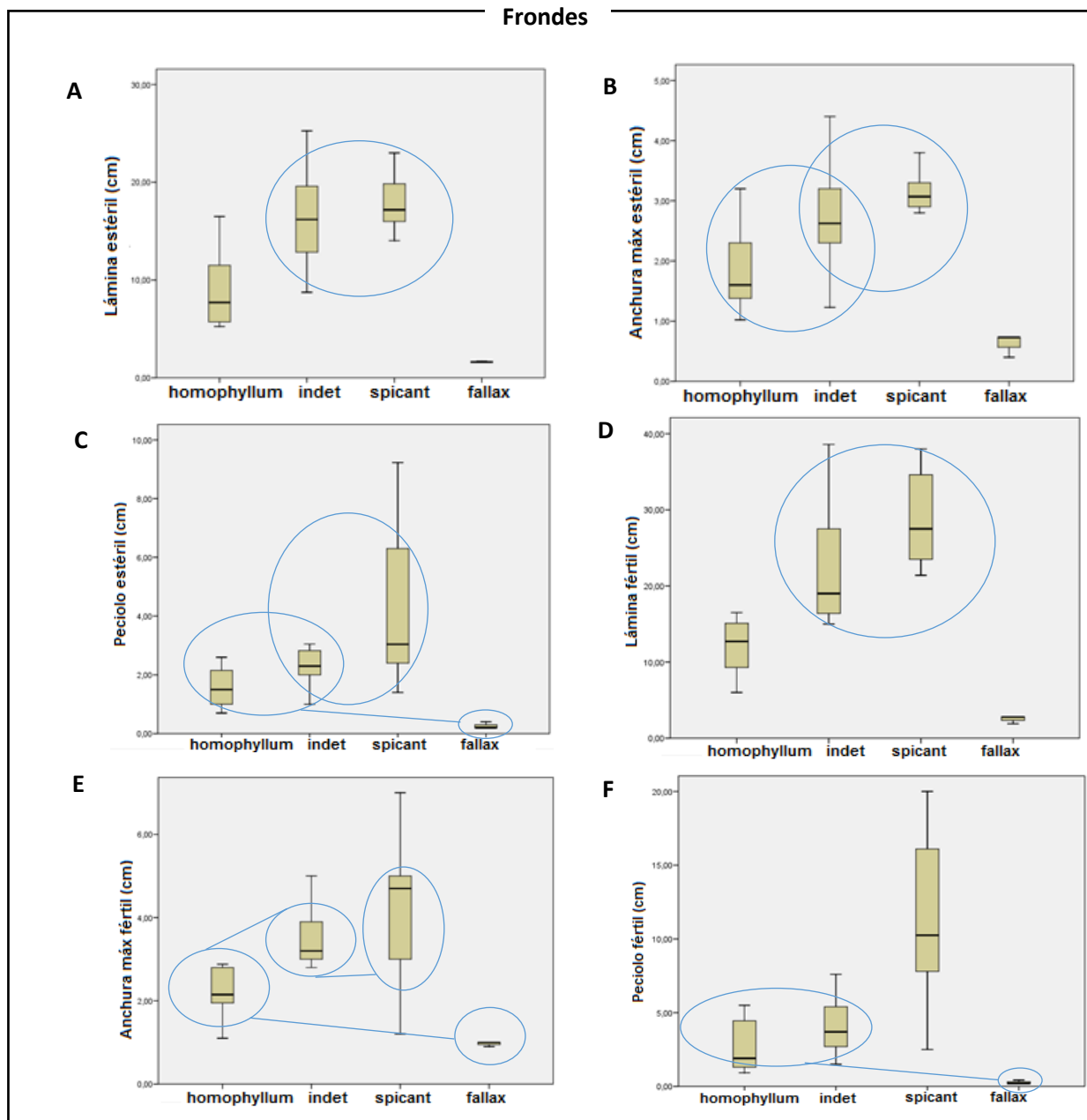


Figura 5.- Diagramas de cajas en los que se rodean y/o conectan los grupos donde el test HDS de Tukey no pudo discriminar medias para los valores en las distintas formas de: A. Lámina estéril B. Anchura máxima de lámina estéril C. Longitud del peciolo estéril. D. Lámina fértil. E. Anchura máxima de la lámina fértil. F. Longitud del peciolo fértil.

Podemos observar que las medidas de la longitud y de la anchura en la lámina estéril y la longitud de la lámina fértil nos permiten discriminar perfectamente a *spicant*, *homophyllum* y *fallax*, que forman tres grupos separados, pero no podemos discriminar el morfotipo indeterminado de *spicant* en el caso de la longitud de la lámina ni de *spicant* u *homophyllum* en el caso de la anchura máxima. El peciolo es menos informativo, solo nos permite distinguir a *spicant* y el morfotipo indeterminado de *homophyllum* y *fallax* en el caso de la fronde estéril y a *spicant* de todos los demás en el caso del peciolo fértil, lo que deja patente la estrategia exclusiva de la variedad *spicant* de alargar significativamente el peciolo de sus frondes fértiles por encima de las frondes estériles.

Sección de la pinna

El corte histológico de la pinna fértil mostró diferencias en el perfil de las mismas, que va de recto a curvo, en la profundidad del surco, la longitud del indusio y la distancia entre el receptáculo y la costa, tal y como se puede observar en la Figura 6.



Figura 6.- Cortes histológicos de las pinnas fértiles. A. *S. spicant* var. *homophyllum* (SA-IND11); B. *S. spicant* var. *homophyllum* (GA-IND04); C. *S. spicant* var. *spicant* (CA-IND04); D. *S. spicant* var. *fallax* (IS-IND01); E. *S. spicant* var. *cf* (AS-IND11).

Los datos biométricos del grosor de la pinna y la longitud del surco mostraron diferencias significativas en el ANOVA ($P < 0,001$) (Figura 7).

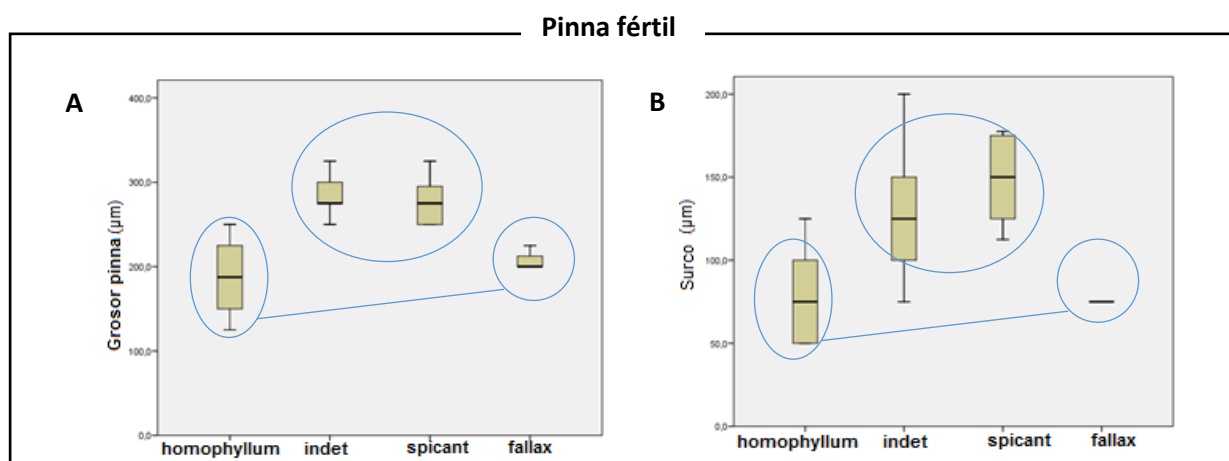


Figura 7.- Diagramas de cajas en los que se rodean y/o conectan los grupos donde el test HDS de Tukey no pudo discriminar medias para los valores en las distintas formas de: A. Grosor de pinna B. Profundidad de surco.

La variedad *spicant* es rápidamente reconocible, muy diferente de las otras, por la larga distancia entre el receptáculo y la costa y su perfil anguloso. Así mismo, su surco costal adaxial es sin el más profundo, y la longitud del indusio es significativamente mayor que el resto. El perfil de *homophyllum* y el morfotipo indeterminado es parecido, siendo muy plano y recto, con longitudes de induso parecidas y un surco costal adaxial similar. A pesar de que *homophyllum* ha resultado ser bastante variable, siempre es posible diferenciarlo con facilidad de *spicant*, aunque las similitudes mencionadas hacen complicado diferenciar el nuevo morfotipo de esta forma. La var. *fallax* es fácilmente reconocible por su tamaño, aunque la forma general es similar a algunos individuos de *homophyllum*.

Las pinnas fértiles revelan que el grosor de las mismas es diferente en las formas, quedando, por una parte, *homophyllum* y *fallax* (menos gruesos) y por otra *spicant* y el morfotipo indeterminado (más gruesos). Aunque cualitativamente habíamos tenido la impresión de que el surco era mayor en *spicant* que en las otras tres formas, el análisis solo es capaz de discriminarlo de *fallax* y *homophyllum*, pero no del morfotipo indeterminado.

Esporas y esporangios

El número de células del anillo del esporangio observado en las distintas formas se refleja en la Tabla 2.

Forma	Número de células en el anillo
<i>S. spicant</i> var <i>spicant</i>	13-15
<i>S. spicant</i> var <i>homophyllum</i>	16-20
<i>S. spicant</i> var <i>fallax</i>	16-17
<i>S. spicant</i> morfotipo indeterminado	12-20

Tabla 2.- Rangos de número de células en el anillo encontradas en los diferentes individuos y media de tamaño de las esporas en cada forma.

Aunque tanto los rangos de números de células del anillo como el aspecto de los esporangios (Figura 8) podrían hacernos pensar que existen diferencias en este carácter, el ANOVA no fue capaz de discriminar ningún grupo ($P=0,324$).

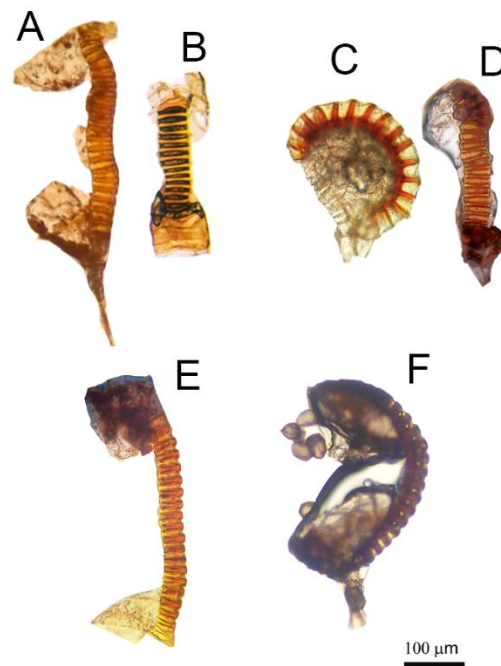


Figura 8.- Esporangios. A. *Struthiopteris spicant* morfotipo indeterminado (SA-IND04); B. *Struthiopteris spicant* morfotipo indeterminado (AS-IND12); C. *Struthiopteris spicant* var *fallax* (IS-IND01). D. *Struthiopteris spicant* var *fallax* (IS-IND02). E. *Struthiopteris spicant* var *homophyllum* (MACB 32367); F. *Struthiopteris spicant* var *spicant* (CA-IND01).

En cuanto al tamaño de las esporas, el ANOVA no detectó ninguna diferencia en las medias de dichas medidas en todas las formas (largo espora $P=0,669$, ancho de espora $P=0,352$).

Análisis de componentes principales

Con las variables cuyos análisis ANOVA mostraron diferencias significativas en las medias, se procedió a un análisis de componentes principales (ACP).

Tal y como se puede comprobar en la tabla de varianza total explicada (Tabla 3), el 77,942% de la varianza queda recogida por los dos primeros componentes del análisis, por lo que se considera que con dos ejes se puede explicar significativamente el modelo.

Componente	Autovalores iniciales	
	% de la varianza	% acumulado
1	60,38	60,380
2	17,562	77,942
3	6,961	84,903
4	5,120	90,023
5	4,109	94,133
6	2,633	96,766
7	1,328	98,094
8	1,044	99,138
9	0,721	99,859
10	0,141	100

Tabla 3.- Tabla de autovalores de los componentes generados para el ACP. Se indica en una columna el porcentaje de varianza absorbido por el componente y en otra el porcentaje acumulado teniendo en cuenta los componentes anteriores. Se sombrea en gris los componentes que serán utilizados para el gráfico de dispersión.

La matriz de coeficientes para el cálculo de las puntuaciones en las componentes (Tabla 4) revela los factores de carga que aporta cada componente, dilucidando que en el eje 1 dichos componentes serán, sobre todo, las longitudes de lámina, sus anchuras máximas, el largo de escama, en menor medida el peciolo y la base de escama y prácticamente sin significación el grosor de la pinna y la longitud del surco costal. Así mismo, en el eje 2 las variables más explicativas son el peciolo, la base de la escama, el grosor de pinna y la longitud del surco costal.

Variable	Componente	
	1	2
Lámina estéril	0,152	0,01
Anchura máxima estéril	0,147	0,026
Pecíolo estéril	0,131	-0,188
Lámina fértil	0,155	0,017
Anchura máxima fértil	0,144	0,04
Pecíolo fértil	0,128	-0,219
Escama largo	0,135	-0,008
Escama base	0,115	-0,212
Grosor pinna	0,05	0,514
Surco costal adaxial	0,093	0,418

Tabla 4.- Se muestran los factores de carga de cada variable en los dos componentes seleccionados para la realización del ACP. Las casillas sombreadas en verde son las más explicativas para el componente, las amarillas las que tienen valores medios y en naranja las poco o nada explicativas.

Con estos datos, se procedió a realizar un gráfico de dispersión de punto que ilustra la disposición espacial de los individuos de las diferentes formas en este ACP (Figura 9).

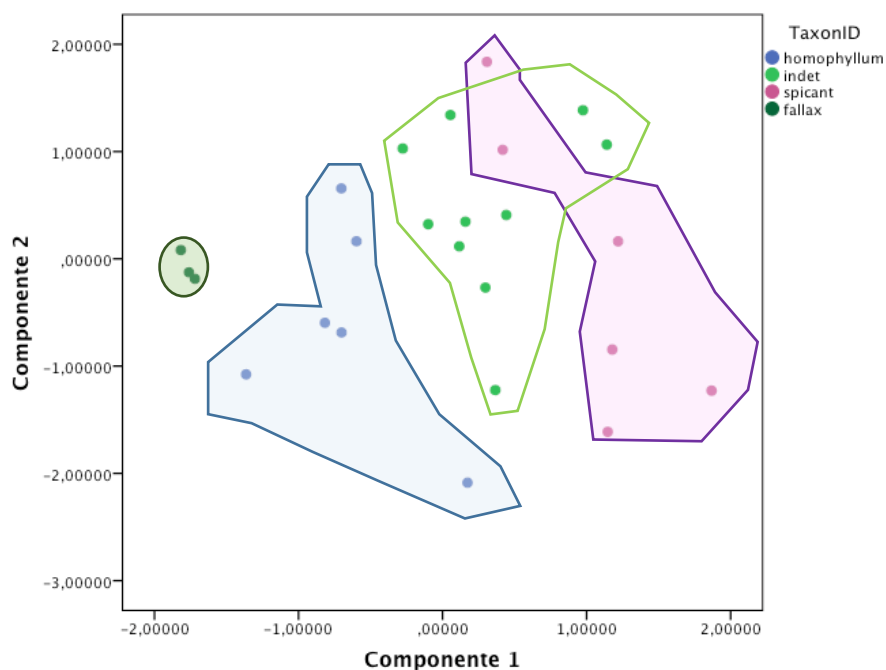


Figura 9.- Gráfico de dispersión resultado del ACP con las diferentes variables en las cuatro formas de *S. spicant*. Se han rodeado los grupos originados por cada una de las 4 formas, y se han sombreado aquellos que quedan bien definidos.

En el diagrama de dispersión observamos cómo se han ordenado los individuos de menor a mayor tamaño de láminas en el eje de abscisas, y de menor a mayor grosor de pinna y profundidad de surco en el eje de ordenadas, considerando los factores de carga de cada variable para cada componente. La topología resultante diferencia claramente los grupos de *spicant*, *fallax* y *homophyllum*, pero el morfotipo indeterminado aparece entremezclado.

Estudio molecular

Marcadores cloroplásticos

De los marcadores cloroplásticos utilizados, ninguno mostró ningún sitio polimórfico en ninguna de las formas de estudio. No obstante, nos servimos de las secuencias obtenidas de los marcadores *rbcL* y *psbA* para realizar un árbol consenso del género, ya que esto no se había realizado hasta ahora con la totalidad de especies de *Struthiopteris*, y solo se utilizaron secuencias de *S. spicant* y *S. castanea* a la hora de separar el género de *Blechnum* (Gasper *et al*, 2016a). El resultado se puede observar en la Figura 10.

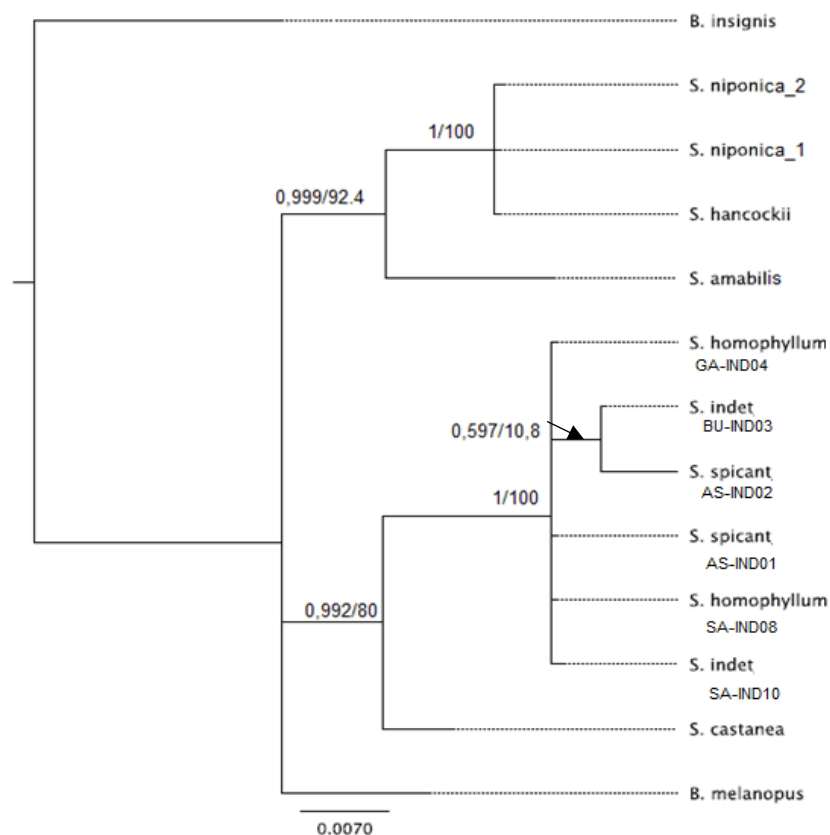


Figura 10.- Árbol filogenético del género *Struthiopteris*. Los números en las ramas indican probabilidad posterior/boostrap. Los grupos externos empleados son *Brasilea insignis* y *Blechnidium melanopus*, géneros hermanos de *Struthiopteris* (Gasper *et al*, 2016a).

ISSR

Los marcadores ISSR *SCAR2* y *SCAR3* mostraron diferentes sitios polimórficos en las secuencias analizadas. Dichos sitios pueden consultarse en las Tablas 5 y 6.

Muestra	SCAR2	
	Posiciones polimórficas	
	10-11	89-99
<i>S. spicant_1</i>	--	G - CGCTCGTCCG
<i>S. spicant_2</i>	--	T - CGCTCGTCCG
<i>S. spicant_3</i>	--	CGCTCGC -----
<i>S. spicant_4</i>	--	CGCTCTC -----
<i>S. spicant_5</i>	--	C - CTCTC -----
Morfotipo indet. (SA-IND10)	--	C - CTCTCG ----
Morfotipo indet. (AS-IND12)	--	C - CTCTCC ----
Morfotipo indet. (SO-IND01)	--	C - CTCTCC ----
<i>S. homophyllum</i> (SA-IND08)	CC	C - CTCTCC ----
<i>S. homophyllum</i> (GA-IND04)	CC	C - CTCTCC ----

Tabla 5.- La tabla refleja los sitios polimórficos encontrados el ISSR *SCAR2*. Se indican las posiciones donde se hayan estos sitios polimórficos y el fragmento de secuencia para dichas bases en cada una de las secuencias con las bases que se diferencian en negrita.

Muestra	SCAR3	
	Posiciones polimórficas	
	186	74-76
<i>S. spicant_6</i>	G	CTC
<i>S. spicant_7</i>	G	CTC
<i>S. spicant_8</i>	G	CTC
<i>S. spicant_9</i>	G	CTC
<i>S. spicant_10</i>	T	CTC
<i>S. homophyllum</i> (GA-IND04)	G	TGG
<i>S. homophyllum</i> (SA-IND08)	G	TGG
Morfotipo indet. (SO-IND01)	G	CGG
Morfotipo indet. (GA-IND06)	G	TGG
Morfotipo indet. (AS-IND12)	G	TGG

Tabla 6.- La tabla refleja los sitios polimórficos encontrados el ISSR *SCAR3*. Se indican las posiciones donde se hayan estos sitios polimórficos y el fragmento de secuencia para dichas bases en cada una de las secuencias con las bases que se diferencian en negrita.

5.- Discusión

Las diferencias en las frondes, en cuanto a forma y tamaño, ya han sido anteriormente apreciadas como diferentes tanto en *homophyllum* (Merino, 1898; Löve, A. & Löve 1968; Ormonde, 1986; Wasowicz *et al.*, 2017) como en *fallax* (Görlund, 1881; Löve, A. & Löve 1968; Wasowicz *et al.*, 2017), coincidiendo nuestros resultados con lo expuesto en estas publicaciones. No obstante, en este trabajo se ha aportado un apoyo estadístico relacionando las formas que no ha sido documentado antes. Así mismo, se ha caracterizado el nuevo morfotipo, aunque las comparaciones estadísticas de medias no han permitido su discriminación completa de la variedad *spicant*.

Las escamas del rizoma son estructuras ampliamente utilizadas en la taxonomía de los helechos (Kramer *et al.*, 1990) y, específicamente, en el caso de las Blechnáceas (Kramer *et al.*, 1990; Rolleri & Prada, 2006; Rothfels *et al.*, 2012), siendo moderadamente importantes a la hora de la discriminación de géneros y especies. En nuestro estudio, las escamas observadas en la variedad *spicant* coinciden con lo ya conocido en estudios previos (Rolleri & Prada, 2006), en lo que atañe a la forma general, el tamaño y la zona central de células esclerosadas. Las escamas observadas en las demás formas no están conocidas, por lo que son un aporte nuevo que consideramos bastante importante, ya que en ocasiones la variedad *homophyllum* y *spicant* pueden confundirse si las frondes fértiles no están desarrolladas, sin embargo, con este carácter son fácilmente distinguibles. Aunque la variedad *fallax* es inconfundible por su tamaño y ecología, sus escamas son también un aporte novedoso que no se había incluido en sus descripciones anteriormente.

El corte trasversal de la pinna fértil también es bastante informativo, y parece ofrecer valiosos caracteres para separar los géneros y especies en la familia Blechnaceae (Prada *et al.*, 2006; Vicent, 2017). Estos trabajos anatómicos previos describen la anatomía y las estructuras asociadas a las pinnas fértiles de *S. spicant*, que, en lo básico, coinciden con nuestras apreciaciones: pinna contraída, curvada y surcada con un surco en V y una o dos haces conductores (Rolleri & Prada, 2006). De las demás formas no hay datos previos, por lo que aportamos nueva información anatómica de las mismas que, como en el caso de las escamas, ha permitido demostrar como este carácter permite la discriminación de las formas *homophyllum*, *fallax* y el morfotipo nuevo.

El número de células del anillo esporangial ha mostrado también claras diferencias entre las distintas formas, solo mostrando solapamientos el rango de células del morfotipo

indeterminado. Este resultado es muy interesante, dado que, para los géneros de Blechnáceas, el número de las células del anillo parece ser un buen carácter diagnóstico específico (Prada *et al.* 2016).

Las esporas son también un carácter de extrema importancia a la hora de realizar clasificaciones taxonómicas en helechos (Tryon *et al.*, 1991) y, aunque no se han encontrado diferencias en el tamaño esporal, que ha coincidido con lo previamente publicado (Pasarelli *et al.*, 2007; Pasarelli *et al.*, 2010), habría que considerar que en este taxón las esporas tienen una microornamentación muy leve y muy difícil o imposible de apreciar al microscopio óptico (Pasarelli *et al.*, 2007; Pasarelli *et al.*, 2010), por esto sería necesario en un futuro un estudio con microscopio electrónico que permitiese discernir si esta microornamentación esporal es diferente en las distintas formas.

La técnica estadística de análisis de componentes principales ha demostrado ser una herramienta útil en otros estudios de discriminación de especies con morfologías aparentemente parecidas (Dubuisson *et al.*, 2016). En nuestro caso, ha sido un análisis que nos ha permitido englobar las comparaciones de medias, viendo como efectivamente las formas *spicant*, *homophyllum* y *fallax* se distinguen claramente, aunque el nuevo morfotipo se entremezcla. Topologías de ACPs con puntos más entremezcados han sido consideradas por otros autores para distinguir especies (Dubuisson, *et al.*, 2016), pero en nuestro caso, teniendo en cuenta el resto de datos que siempre muestran al morfotipo nuevo como difícil de distinguir de *homophyllum* y sobretodo de *spicant*, nos mostramos reacios a considerarlo un grupo definido por ahora. Una caracterización de más muestras permitiría un ACP más informativo en el futuro, permitiendo decidir con más seguridad si esta forma nueva puede considerarse un grupo diferente del resto.

El árbol obtenido con los marcadores *rbcL* y *psbA* es altamente informativo, ya que en la nueva filogenia de la familia Blechnaceae este género solo fue resuelto con dos de sus especies (de Gasper *et al.*, 2016b). Así, observamos dos clados en el género, uno con nuestro complejo con *S. castanea* como grupo hermano y otro con el resto de especies (*S. amabilis*, *S. hanckokii*, y *S. niponica*). Por otra parte, observamos que uno de los grupos externos, *B. melanopus*, aparece como grupo hermano del género en lugar de enraizarse fuera del grupo. Este hecho, contradictorio en apariencia, puede ser resultado también de la escasa muestra de las filogenias anteriores, ya citadas. Esto nos hace dudar sobre la resolución de estos géneros, información que ha de ser revisada más adelante.

Los bajos niveles de variabilidad genética poblacional en esta especie han sido documentados en otras ocasiones (Soltis & Soltis, 1988), hecho que hemos detectado también con nuestras poblaciones. Esto ha hecho que haya sido muy complicado diferenciar los individuos; por lo que parece en principio lógico haber encontrado una nula diferenciación en los marcadores cloroplásticos utilizados dentro de nuestras formas. Además, debemos tener en cuenta que entre taxones altamente emparentados las diferencias cloroplásticas, al ser este genoma muy conservado y transmitido de forma uniparental (Wolfe *et al.*, 1987), suelen ser menores.

Por otra parte, los marcadores de tipo ISSR *SCAR2* y *SCAR3* sí parecen más informativos. Encontramos sitios polimórficos en las posiciones de las secuencias en las que eran conocidos (Korpelainen & Pietiläinen, 2007), y algunas nuevas y exclusivas de la variedad *homophyllum*. Hay que resaltar que, en el marcador *SCAR3*, las secuencias de autores previos (Korpelainen & Pietiläinen, 2007) describen un sitio en la posición 186, en la que una de sus secuencias difiere en un nucleótido, pero ninguna de nuestras secuencias presenta dicho cambio. Parece que la información que aportan estos marcadores podría contribuir al objetivo de la separación de esta forma, por lo que sería conveniente repetir dichos análisis con más individuos de estas dos formas e incluir la forma *fallax*.

6.- Conclusiones

Se ha analizado una muestra representativa de formas del complejo *S. spicant*, que ha puesto de manifiesto una importante variación morfológica, basada en datos macromorfológicos, micromorfológicos y moleculares. El complejo de interés, por tanto, estaba poco estudiado, habiéndose descrito, incluso, un nuevo morfotipo. La escasa cantidad de estudios en cuanto a estas formas, también se refleja en el hecho de que hemos ampliado el área conocida de *homophyllum*, que se tenía por endémico de Galicia y el norte de Portugal, habiéndose recolectado en Salamanca y La Rioja. Sería necesario seguir haciendo prospecciones de campo en busca de esta forma ya que podría encontrarse en más localidades.

Los datos recabados manifiestan diferencias significativas entre los distintos morfotipos, diferencias apoyadas tanto por los análisis estadísticos como por los moleculares. Hay dos claros grupos, uno formado por *homophyllum* y *fallax* y otro por *spicant* y el morfotipo indeterminado. Aunque dentro del primer grupo, *homophyllum* y *fallax* se diferencian bien entre ellos y de los demás por sus caracteres anatómicos, morfológicos, ecológicos y corológicos, por su parte *spicant* y el nuevo morfotipo son difícilmente diferenciables.

Todo esto permitiría apoyar una segregación de *homophyllum* y *fallax* hacia entidades de categoría superior a la variedad. Queda pendiente un estudio ulterior para dilucidar la posición taxonómica de la nuevo morfotipo.

7.- Importancia del trabajo y líneas futuras

Estos estudios de investigación taxonómica son fundamentales para una correcta comprensión de la biodiversidad del planeta, lo cual, a su vez, es absolutamente necesario como paso previo a cualquier acción proteccionista y de conservación. Máxime, cuando se trata de organismos de distribución geográfica restringida, como es el caso de las dos formas que se estudian en el presente trabajo. Efectivamente, la forma *fallax* es el único helecho endémico de Islandia, mientras que la forma *homophyllum* es endémica de la Península Ibérica (de hecho, es de los muy pocos helechos endémicos con que cuenta esta área geográfica). La posibilidad de que estas variedades puedan pasar a ser consideradas especies haría que estas plantas fueran merecedoras de una mayor atención desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad europea, tan castigada por siglos de explotación y alteración antrópica.

Adicionalmente, con este tipo de estudios se progresa en el conocimiento de la biología y las relaciones evolutivas entre los taxones, pudiendo por tanto desentrañarse correctamente el origen y la evolución de los mismos, en un contexto poblacional. Por ello, se podrá entender mejor el futuro de las poblaciones de estas plantas y sus requerimientos de conservación, para acometer con precisión y eficacia las necesarias propuestas de gestión.

Se propone seguir trabajando en esta línea, con individuos de más localidades, más caracteres como la microornamentación esporal o el estudio de los gametófitos y con marcadores moleculares de tipo ISSR, que son los que han dilucidado diferencias entre los distintos morfotipos, a fin de esclarecer definitivamente el estatus taxonómico del conjunto de formas que constituye *Struthiopteris spicant*.

8.-Agradecimientos

En primer lugar, gracias a nuestro colega de la Universidad de Akureiri Pawel Wasowicz, que nos aportó el material y conocimientos sobre la variedad islandesa *fallax* de *S. spicant*.

Quería también agradecer a todos aquellos profesores que me han transmitido todo lo que hoy me hace ser quien soy, desde los conocimientos al entusiasmo por esta maravillosa ciencia. En concreto, gracias a Carmen Prada, que me habló por primera vez de la botánica criptogámica y siempre estuvo ahí para ayudarnos a sacar conclusiones gracias a sus años de inmensa y maravillosa experiencia, y para prestarnos de forma desinteresada todo el material que fuera necesario.

A mis profesores, amigos y compañeros del *Tropical Fern and Lycophytes course*, por escuchar mi proyecto cuando tan solo era un pequeño embrión, ayudarme con sus sugerencias, por compartir sus trabajos conmigo y por la experiencia que me regalaron en el trópico, por ayudarme a adentrarme en el mundo de la pteridología, transmitirme los conocimientos de los que hoy disfruto y animarme a seguir mi vida profesional por este camino.

A todos mis compañeros que siempre me han apoyado, en especial a Pablo por ayudarme tanto siempre y por estar a mi lado en este proyecto, animarme a seguir y porque sin él esto no habría sido posible. Por supuesto, también a Fidel, que tanto me ayudó a sacar todo adelante cuando me desbordaba, por escuchar mis avances y por todo lo que ha hecho por mí este año, y a Miguel, que se jugó la integridad física conmigo en aquel talud en algún punto del anillo de Kerry en Irlanda para coger tres individuos para mi estudio. A mis compañeros de laboratorio, que siempre hicieron más amenas las horas de trabajo.

Por último, y más importante, gracias a José María Gabriel y Galán, mi tutor, profesor y colega, sin el que nada de lo mencionado anteriormente sería posible, que nunca ha dejado de ayudarme y de transmitirme el amor por lo que hace (y ahora hacemos), por guiarme y ayudarme a ser cada día mejor bióloga.

9.- Referencias

- Darriba, D., G. Taboada, R. Doallo, & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.
- Dubuisson, J. Bauret, L., Aurelie, G., Li, T., Ebihara, A. & Hennequin, S. 2016. Discussion on the taxonomy of African fern *Abrodictyum rigidum* (Sw.) Ebihara & Dubuisson and description of two new *Abrodictyum* C.Presl species (Hymenophyllaceae, Polypodiidae) for the Afro-Malagasy region. *Phytotaxa*, 284 (3): 151-168.
- De Gasper, A., Almeida, T., Dittrich, V., Smith, A. & Salino, A. 2016a. Molecular phylogeny of the fern family Blechnaceae (Polypodiales) with a revised genus-level treatment. *Cladistics*.
- De Gasper, A., Almeida, T., Dittrich, V., Smith, A. & Salino, A. 2016b. A classification for Blechnaceae (Polypodiales: Polypodiopsida): New genera, resurrected names, and combinations. *Phytotaxa*, 275:3 191-227.
- Gabriel y Galán, J. M., Prada, C., Rolleri, C., Ainouche & A., Vicent, M. 2013. cpDNA supports the identification of the major lineages of American *Blechnum* (Blechnaceae, Polypodiopsida) established by morphology. *Turkish Journal of Botany*, 37: 769-777.
- GBIF (2017): *Global Biodiversity Information Facility*. <http://www.gbif.org/species/> (accedido en mayo 2017).
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
- Ishikawa, H., Watano, Y., Kano, K., Ito, M. & Kurita, S. 2001. Development of primer sets for PCR amplification of the *PgiC* gene in ferns. *The botanical Society of Japan and Springer*. 115: 65-70.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock % S. Buxton. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Korpelainen, H. & Pietiläinen, M. 2007. Effort to reconstruct past population history in the fern *Blechnum spicant*. *The botanical Society of Japan and Springer*. 121: 293-298.

- Kramer, K.U., Chambers, T.C. & Hennipman, E. 1990 Blechnaceae en: Kramer, K.U. & Green, P. S., Eds. *The Families and Genera of Vascular Plants. Vol 1. Pteridophytes and Gymnosperms*. págs. 60-68. Springer-Verlag, Wien, Berlin.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Löve, A. & Löve D. 1968. Cytotaxonomy of *Blechnum spicant*. *Collectanea Botanica*, 7 :2 665-676.
- Merino, R. 1898. Contribución a la Flora de Galicia. *Suplemento I*, Tuy.
- Ormonde J., 1986, *Blechnum* en Ormonde J. Eds, *Flora Iberica I*, pág 150-153, Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Passarelli, L. 2007. Estudios esporales en especies del grupo *Blechnum penna-marina* (Blechnaceae-Pteridophyta). *Acta Botanica Malacitana* 32: 1-19.
- Passarelli, L., Gabriel y Galán, J.M., Prada, P. & Rolleri, C. 2010. Spore morphology and ornamentation in the genus *Blechnum* (Blechnaceae, Pteridophyta). *Grana* 49: 243-262.
- Perrie, L, Wilson, R., Shepherd, L., Ohlsen, D., Batty, E., Brownsey, P. & Bayly, M.J. 2014. Molecular phylogenetics and generic taxonomy of Blechnaceae ferns. *Taxon* 63: 745-758.
- Rolleri, C. & Prada, C. 2006. Revisión de los grupos de especies del género *Blechnum* (Blechnaceae-Pteridophyta): el grupo *B. penna-marina*. *Acta Botánica Malacitana*, 31: 7-50.
- Ronquist, F., and J. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574
- Rothfels, C., Sundue, M., Kuo, L., Larsson, A., Masahiro, K., Schuettpelz, E. & Kathleen, P. 2012. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon*, 61:3 515-533.
- Ruzin, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. University Press, Oxford.
- Salvo Tierra, E. 1990. 26. Familia Blechnaceae en: *Guía de helechos de la península Ibérica y Baleares*. págs 150-153. Ediciones Pirámide, Madrid.

- Shepherd, L., Perrie, L., Parris, B. & Brownsey, P. 2007. A molecular phylogeny for the New Zealand Blechnaceae ferns from analyses of chloroplast trnL-trnF DNA sequences. *New Zealand Journal of Botany*, 45:1, 67-80.
- Smith, A. R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H. & Wolf, P.G. 2008. Fern classification en: Ranker TA, Haufler CH, Eds, *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. págs. 417-467. Cambridge University Press, Cambridge.
- Soltis P. & Soltis D. 1988. Genetic Variations and Population Structure in the Fern *Blechnum spicant* (Blechnaceae) from Western North America. *American Journal of Botany*. 75:1, 37-44.
- Tryon, A. F. & Lugardon, B. 1991. *Spores of the Pteridophyta*. Springer, New York.
- Vicent, M. 2017. Sistemática de la familia Blechnaceae (Polypodiopsida): filogenia de *Lomadirium* y *Parablechnum* p.p. y aspectos evolutivos de las pinnas fértiles. Tesis doctoral, Facultad de Biología, Universidad Complutense.
- Wasowicz, P., Gabriel y Galán, J. M. & Pino Pérez, R. 2017. New combinations in *Struthiopteris spicant* for the European flora. *Phytotaxa*, 302:2 198-200.
- Wolfe, K.Y., Li, W.H. & Sharp, P.M. 1987. Rates of substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *PNAS*. 84: 9054-9058.

10.-Anexos

1.-Material biológico

En este anexo se indica, para cada forma de estudio, las localidades de los distintos individuos utilizados para la recolección de datos, así como su recolector, fecha y testigo en el herbario MACB de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, junto con los nombres para cada individuo entre paréntesis (las primeras dos letras referentes a la localidad seguido de un número distintivo). Se indica con (*) los individuos utilizados en los estudios moleculares.

Struthiopteris spicant var. *spicant* (L.) Weiss

ESPAÑA. Asturias: Valdés, Paladeporre, *Gabriel y Galán*, 22/03/2016, MACB 109612 (AS-IND01*; AS-IND02*; AS-IND09; AS-IND13; AS-IND14; AS-IND16; AS-IND17). Valdés, Luear, *Gabriel y Galán*, 12/04/2017, MACB 109615 (AS-IND26; AS-IND28). **Cantabria:** Camaleño, Cosgaya, *Gabriel y Galán*, MACB 109622 (CA-IND02; CA-IND03; CA-IND04; CA-IND05). **Galicia:** Pontevedra, Monte Aloya, Tuy, *Pajarón & Pangua*, 15/07/1993, MACB 59142 (GA-IND12). **Madrid:** Dehesa de Somosierra, *Gabriel y Galán & Molino*, 31/05/2017, MACB 109611 (MA-IND02). **Salamanca:** San Miguel de Valero, *Gabriel y Galán*, 14/15/16, MACB 109624 (SA-IND01). Batuecas, *Gabriel y Galán*, 15/05/2016, MACB 109627 (SA-IND12).

IRLANDA. Iveragh, Caherdaniel, *Molino & Pachón*, 17/07/2016, MACB 109619 (KE-IND03).

Struthiopteris spicant var. *homophyllum* (Merino) *Gabriel y Galán & Pino*

ESPAÑA. Galicia: Vigo, Beade, *Gabriel y Galán*, 18/03/2016, MACB 109616 (GA-IND01; GA-IND02). Pontevedra, entre Tabagón y Tomiño, *Gabriel y Galán*, 19/03/2016, MACB 109617 (GA-IND04*). Pontevedra, Mondariz, *Gabriel y Galán*, 20/03/2016, MACB 109618 (GA-IND05). La Coruña, Lousame, subida a Iroite, *Quintanilla & Pías*, 19/04/1998, MACB 92413 (GA-IND09). La Coruña, Santiago, Cantaleta, *Barrera*, 29/07/1967, MACB 32367, (GA-IND10). **La Rioja:** Valgañón, Sierra de la Demanda, *Gabriel y Galán*, 27/05/2017, MACB 109623 (RI-IND06). **Salamanca:** Batuecas, *Gabriel y Galán*, 15/05/2016, MACB 109626 (SA-IND07, SA-IND09, SA-IND10*, SA-IND11).

PORTUGAL. Braga, Vieira do Minho. *Prada*, 1/10/2004, MACB 109621 (PO-IND01).

Struthiopteris spicant var. *fallax* (Lange) Wasowicz & *Gabriel y Galán*

ISLANDIA. Deildartunguhver, *Wasowicz & Gabriel y Galán*, MACB 109359 (IS-IND01; IS-IND02; IS-IND03).

Struthiopteris spicant (L.) Weiss, morfotipo indeterminado

ESPAÑA. Asturias: Valdés, Paladeporre, *Gabriel y Galán*, 22/03/2016, MACB 109613 (AS-IND10; AS-IND11; AS-IND12*; AS-IND18) & MACB 109615 (AS-IND22; AS-IND25; AS-IND37; AS-IND39). **Burgos:** Sierra de San Millán. *Fuentes*, 27/09/1975, MACB 5994 (BU-IND03*). **Galicia:** Pontevedra, Mondariz, *Gabriel y Galán*, 20/03/2016, MACB 109618 (GA-IND06*, GA-IND08). Pontevedra, Redondela, *Barrera*, 1/11/1976, MACB 4769, (GA-IND11). **Salamanca:** San Miguel de Valero, *Gabriel y Galán*, 14/05/2016, MACB 109625 (SA-IND02; SA-IND03; SA-IND04; SA-IND08*). Batuecas, *Gabriel y Galán*, 15/05/2016, MACB 109628 (SA-IND06). **Soria:** Vinuesa, Picos de Urbión, Laguna Negra, *Molino & de la Fuente*, 26/10/2016, MACB 109620 (SO-IND01*). **Tenerife:** Montes de Anaga, cerca de Pico del Inglés, *Santos*, 25/10/1989, MACB 36152, (TE-IND01).

2.-Secuencias

Referencias GenBank de las secuencias, ordenadas por marcador y taxón; en paréntesis se hace referencia al voucher asociado (pliego de herbario o colector), si se conoce.

Brainea insignis (Hook.) J.Sm: (Nakahira & Kato); *rbcL*, AB040576; *psbA*, KC572552.

Blechnidium melanopus (Hook.) T. Moore: (PKnapp 3355); *rbcL*, KU898627.

Struthiopteris niponica_1 (Kunze) Nakai: (TNS773471); *rbcL* AB575053; *psbA*, AB575683. *Struthiopteris niponica_2* (Kunze) Nakai: (TNS763250), *rbcL*, AB575054; (TNS7632509), *psbA*, AB575684.

Struthiopteris hanckokii (Hance) Tagawa, (TNS776516), *rbcL*, AB575052; *psbA* AB575682.

Struthiopteris amabilis (Makino) Ching, (TNS763339) *rbcL*, AB575050. *psbA*, AB575680.

Struthiopteris castanea (Makino & Nemoto) Nakai, (Nakahira, & Kato), *rbcL*, AB040549; (TNS763339), *psbA*, AB575681.

Struthiopteris spicant_1 (L.) Weiss, (092307(H)), *SCAR2*, EF407540. *Struthiopteris spicant_2* (L.) Weiss, (1127577(H)), *SCAR2*, EF407545. *Struthiopteris spicant_3* (L.) Weiss, (1579154(H)), *SCAR2*, EF407549. *Struthiopteris spicant_4* (L.) Weiss, (1127651(H)), *SCAR2*, EF407546. *Struthiopteris spicant_5* (L.) Weiss, (1127654(H)), *SCAR2*, EF407544. *Struthiopteris spicant_6* (L.) Weiss, (1127661 (H)), *SCAR3*, EF407536. *Struthiopteris spicant_7* (L.) Weiss, (1151566 (H)), *SCAR3*, EF407527. *Struthiopteris spicant_8* (L.) Weiss, (1650372 (H)) *SCAR3*, EF407534. *Struthiopteris spicant_9* (L.) Weiss, (1127030 (H)), *SCAR3*, EF407526. *Struthiopteris spicant_10* (L.) Weiss, (1650557(H)), *SCAR3*, EF407535.

3. Cebadores forward (F) y reverse (R) y datos de los ciclos de PCR para los distintos marcadores

rbcL: F: CCATTYATGCGTTGGAGAGATCG; R: GAARCGATCTCTCCAACGCAT;

Ciclo: 95°C 5' + [45''95°C+1'55°C+1'72°C]x35 +10'72°C.

trnL-F: F: ATTTGAACTGGTGACACGAG; R: GGCAGCCCCCARATTCAGGGRAACC;

Ciclo: 35x[30''94°C+1'53°C+0'30''72°C] 7'72°C.

trnG-R: F: GCGGGTATAGTTTAGTGGTAA; R: CTATCCATTAGACGATGGACG;

Ciclo: 5'95°C + [30''95°C+45''50°C+ 1'30''72°C]x35 + 8'72°C.

trnS-rps4: F: ATGAATTATTAGTTGTTGAG; R: TACCGGGGTTTCAATC;

Ciclo: 2'95°C+[30''95°C+40''42°C+1'30'' 72°C]x35 + 7'72°C.

psbA-trnH: F: CGCGCATGGTGGATTACACAATCC; R: GTTATGCATGAACGTATTGCTC;

Ciclo: 5'95°C + [1'95°C+ 0'48°C+ 1'72°C]x28 7'72°C.

pgiC: F: TGTCTGGGTCTTTTGATAAGC; R: GCTTCAGGTAACAAGCCTTTG;

Ciclo: 5'95°C+[1'94°C+1'56°C+2'72°C +1'94°C+0'53°C+2'72°C]x3 + +[45''94°C+45''50°C+ 1'30''72°C]x34 +8'72°C.

SCAR2: F: AGAGAGAGAGTTGATTGACCTAC; R: GAGAGAGAGAGTCTAACTACATAAC;

Ciclo: 5'95°C [45''94°C + 45''53°C + 1'72°C]x30 + 8'72°C.

SCAR3: F: GAGATCAGGGGGCTCTTAATTATA; R: AGTACCTCAATAGAGCACTCTTAC;

Ciclo: 5'95°C [45''94°C + 45''53°C + 1'72°C]x30 + 8'72°C.